

令和元年6月3日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17324

研究課題名(和文) 矯正の歯牙移動時におけるオートファジーによる恒常性維持機構の解明

研究課題名(英文) Investigation of the homeostasis retaining mechanism with autophagy in orthodontic tooth movement.

研究代表者

中村 政裕 (Nakamura, Masahiro)

岡山大学・大学病院・助教

研究者番号：20708036

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：歯に矯正力を加えると骨基質表層の骨芽細胞では、様々な病的環境に曝されるため、細胞の恒常性は低下していると推測されるが、恒常性維持のための詳細な分子メカニズムは未だ不明な点が多い。本研究の結果、実験的歯牙移動時の歯槽骨表層骨芽細胞は低酸素状態にあり、小胞体ストレスに曝されていることが確認できた。また、同一部位でのオートファジーマーカーの発現も確認でき、培養骨芽細胞においても低酸素ストレスに対しオートファジーが亢進していることが確認できた。これらのことから、実験的歯牙移動時の低酸素や小胞体ストレスに曝された骨芽細胞において、細胞恒常性維持のためオートファジーが関与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の学術的意義は、オートファジーが矯正力によるメカニカルストレスだけでなく低酸素や小胞体ストレスに曝された骨芽細胞に対して細胞内恒常性維持機構として機能している可能性を示した点にある。更なる研究を重ねることで歯牙移動の遅延化や歯槽骨以上吸収などの副作用が生じにくい安全な矯正歯科治療を提供することができる点に社会的意義がある。

研究成果の概要(英文)：It is speculated that cell homeostasis is reduced because osteoblasts on the surface of the bone matrix are exposed to various pathological conditions when orthodontic force is applied to teeth. However, details of molecular mechanism for maintaining homeostasis is still unclear. As a result of this study, it was confirmed that osteoblasts on the surface of the alveolar bone during orthodontic tooth movement were in a hypoxic state and were exposed to endoplasmic reticulum stress. In addition, the expression of autophagy markers at the same site was also confirmed, and it was also confirmed that in culture osteoblasts, autophagy was enhanced with respect to hypoxic stress. These findings suggest that autophagy may be involved in maintaining cell homeostasis in osteoblasts exposed to hypoxic and endoplasmic reticulum stress during orthodontic tooth movement.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：実験的歯牙移動 オートファジー 細胞内恒常性維持機構

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

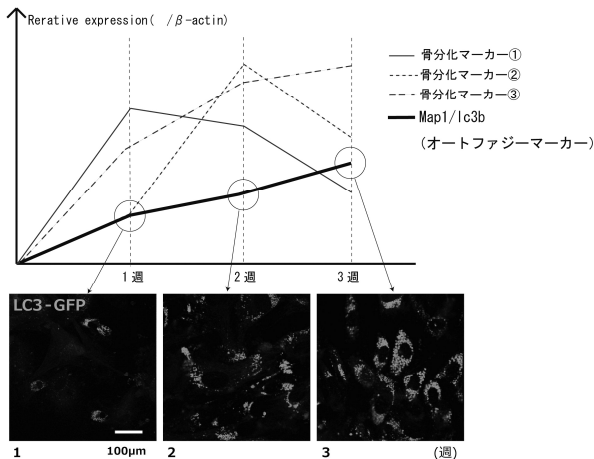
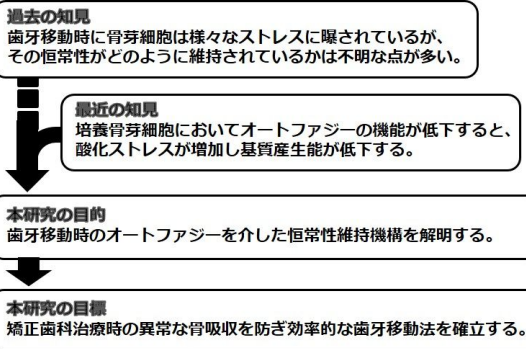
1. 研究開始当初の背景

歯に矯正力を加えると、骨代謝が亢進すると共に、炎症反応や循環障害が生じ、酸化ストレスなど様々な病的環境に曝されていることが明らかとなっている (Kanzaki H., J Dent Res. 2015)。中でも大量の骨基質を産生する骨芽細胞は、種々のストレスや細胞内に蓄積する不要タンパク質によって細胞機能が障害されていると考えられるが、恒常性を保つメカニズムは未だ不明である。

近年注目されているオートファジーは、種々の細胞において不要物質の分解や分解産物の提供に寄与し、骨芽細胞でも基質産生に伴い増加する酸化ストレスに対する恒常性維持機能として関与していることが報告されている (Nollet M., Autophagy 2014)。これらのことから、オートファジーによる骨芽細胞内のストレス応答が細胞の正常な機能維持に重要な役割を果たしている事が示唆される。

我々はすでに骨芽細胞分化とオートファジーの関連について報告を行っており、その結果、*in vivo*にてLC3-GFP トランスジェニックマウスを観察する事で骨組織中の骨芽細胞で恒常的にオートファジーが生じていることを発見し、*in vitro*にて骨芽細胞分化が亢進することでオートファジーが亢進することを明らかにした (右図、Nakamura M., J Okayama Dent Soc. 2012)。これにより、分化した骨芽細胞において骨基質タンパク質合成の亢進した状況下で、細胞の正常機能維持のためにオートファジーが細胞内不要物質を分解し、細胞変性を抑制している可能性が示唆された。しかし、矯正的歯牙移動による種々のストレスを受けた骨芽細胞に対し、オートファジーがどのように関与しているかについての研究は国内外を問わず行われていなかった。

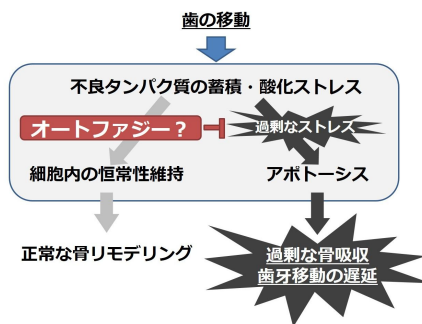
研究開始当初の背景



オートファジーマーカーと骨芽細胞分化マーカーの変動
および培養骨芽細胞に対する LC3-GFP 蛍光染色像
(I型コラーゲン、オステオポンチン、オステオカルシン)

2. 研究の目的

本研究の目的は、積極的な骨基質タンパク質産生が生じる矯正的歯牙移動時において、細胞内に多量の不要タンパク質が蓄積しやすく、酸化ストレスなどの異常環境に曝されるやすい骨芽細胞に対し、細胞の正常機能を維持するためのオートファジーの役割を明らかにすることであり、実験的歯牙移動時の骨芽細胞において細胞の生存にかかわる恒常性維持機構をオートファジーという観点から検討することとした。



3. 研究の方法

(1) LC3-GFP トランスジェニックマウスを用い実験的歯牙移動を行い、オートファジーの時間的・部位的分布を免疫組織化学的観察および定量的解析にて明らかにする。12 週齢 LC3-GFP トランスジェニックマウスをネブタール全身麻酔下で、上顎右側第一臼歯および第二臼歯間にエラストックを装着し、実験的歯牙移動を行う。実験開始 12 時間、24 時間、3 日、5 日、7 日、14 日後に、ジエチルエーテル全身麻酔下で 4%パラホルムアルデヒドを用いて灌流固定を行う。その後、通報に従い、凍結包埋する。上顎骨をミクロトームを用い、7µm の連続切片を作成する。作成した連続凍結切片を用いて、実験的歯牙移動を時間経過ごとに、歯槽骨領域でのオートファジーマーカーである LC3 の発現を免疫蛍光染色法にて観察する。

(2) 骨、軟骨組織特異的にオートファジーをノックアウトした Cre 発現依存的遺伝子欠損マウス (Twist2-cre;ATG5 flox/flox マウス) を用い、microCT による歯牙移動量の変化やそれに伴う周囲組織の変化を免疫染色、In situ ハイブリダイゼーション法にて観察する。また、同マウスから単離した骨芽細胞を使用し様々なストレス下での遺伝子発現量の違いを分子生物学的に解析することでオートファジーによる細胞恒常性維持および細胞死回避メカニズムを解明す

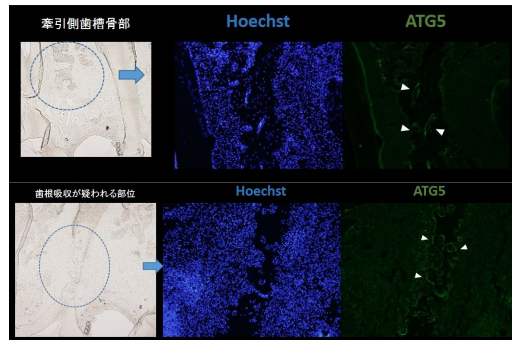
る。具体的にはマウスカルバリアより骨芽細胞を単離、培養し、サブコンフレントに達した際に培養細胞伸展装置 FX-3000TM-Flexercell Strain Unit(Flexercell International Corporation, Hillsborough, NC)を使用し、伸展圧迫ストレス下で培養する。さらに、5%低酸素および過酸化水素水を加え、低酸素、酸化ストレス下で培養する。培養細胞から RNA を回収し、mRNA 発現量の違いを real-time PCR にて解析する。さらに同様にタンパク質を抽出し、ウェスタンブロッティング法を行う。これにより、mRNA 発現量の抑制が、タンパク質レベルにおいても抑制されているかどうかを確認することができ、オートファジー機能低下に關する遺伝子およびタンパク質発現を同定する。

4. 研究成果

(1) 実験的歯牙移動時のオートファジーの発現確認

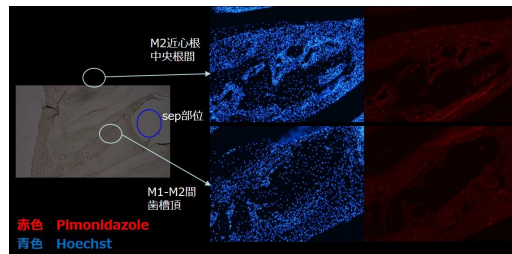
本研究では、LC3-GFPトランスジェニックマウスおよび骨、軟骨組織特異的にオートファジーをノックアウトしたTwist2-cre;ATG5 flox/floxマウスを用いオートファジーの発現動態および機能解析を行う予定であった。

しかし、所属施設の遺伝子改変動物飼育施設の移管に伴い、遺伝子改変マウスの系統維持、作出が困難となったため、C57BL/6マウスに対し実験的歯牙移動を行い、オートファジーの発現を確認した。その結果、牽引側歯槽骨周囲骨芽細胞にオートファジーマーカーであるATG5の発現を認めた。また、興味深いことに歯牙移動時の歯根吸収が生じている歯根表層でも同様に発現を観察することができた。



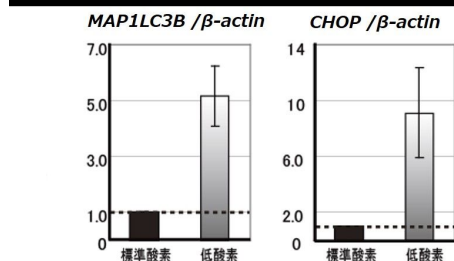
(2) オートファジーによる細胞恒常性維持機能の観察

骨芽細胞周囲の病的環境を観察するため、pimonidazole(60 μg/WTg) を腹腔内投与したところ、低酸素状態が歯牙移動初期から確認された。また、小胞体ストレスマーカーであるCHOPの発現もATG5発現前に同一領域に認められた。さらに、成体マウス頭蓋冠から単離した骨芽細胞において病的環境に対するオートファジーの動態を観察したところ、5%の低酸素ストレス環境下ではオートファジーマーカーの増加が認められ、小胞体ストレスマーカーの増加に伴うオートファジーマーカーの発現上昇も観察することができた。



今後、培養細胞伸展装置

FX-3000TM-Flexercell Strain Unitを使用し伸展圧迫ストレスを負荷し、で標準酸素および低酸素状態で培養を行なっていく予定である。



これらのことから、実験的歯牙移動時の低酸素に曝された骨芽細胞において、低酸素ストレスや小胞体ストレスに対する細胞恒常性維持のためオートファジーが関与している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6．研究組織

(1)研究分担者
なし

(2)研究協力者
なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。